Instytut Hematologii i Transfuzjologii
w Warszawie
Klinika Hematologii
ul. Indiry Gandhi 14, 02-776 Warszawa
tel. +48 22 34 96 313 , fax +48 22 34 96 178

Warszawa, 02.06.2022

Ocena

rozprawy doktorskiej lekarz **Małgorzaty Bernatowicz pt. „Ocena subpopulacji limfocytów T oraz wybranych punktów kontrolnych układu odpornościowego u chorych na ostrą białaczkę szpikową"** wykonanej pod kierunkiem Pana dr hab. Łukasza Bołkuna oraz promotora pomocniczego dr hab. n.med. Andrzeja Eljaszewicza Klinice Hematologii i Chorób Naczyń Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Ostra białaczka szpikowa (ang. *acute myeloid leukemia*¸ AML) stanowi heterogenną grupę chorób. AML charakteryzuje się klonalną proliferacją stransformowanych nowotworowo prekursorów linii mieloidalnej o ograniczonej zdolności do różnicowania się w bardziej dojrzałe elementy komórkowe. Dochodzi w związku z tym do nagromadzenia niedojrzałych form komórek w szpiku kostnym (ang. *bone marrow*, BM), krwi obwodowej (ang. *peripheral blood*, PB), a czasami w innych tkankach, ze zmiennym zmniejszeniem produkcji pozostałych linii komórkowych - prawidłowych krwinek czerwonych, płytek krwi czy dojrzałych granulocytów. Stłumienie prawidłowych linii krwiotworzenia w szpiku przez dynamicznie proliferujący klon białaczkowy skutkuje różnorodnymi konsekwencjami ogólnoustrojowymi, w tym niedokrwistością, małopłytkowością wraz z objawami skazy krwotocznej i zwiększonym ryzykiem ciężkich infekcji.
Zgodnie z definicją Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) z 2016 roku podstawą/kryterium postawienia prawidłowej diagnozy i klasyfikacji AML jest morfologiczna ocena aspiratów krwi obwodowej i szpiku kostnego oraz materiału z biopsji. Większość kategorii AML nadal wymaga identyfikacji 20% lub więcej komórek blastycznych we krwi i/lub szpiku kostnym, a odsetek komórek nowotworowych powinien opierać się na rzeczywistej manualnej ocenie różnicowej liczby komórek, a nie na szacunkach lub na podstawie danych z cytometrii przepływowej. W ostrej białaczce szpikowej z t(15;17), t(8;21), inv(16) lub t(16;16) kryterium blastozy w szpiku ≥20% nie jest wymagane.

Najnowsza klasyfikacja AML wg WHO z 2016 roku opiera się na wynikach badań cytologicznych i fenotypowych oraz analizach cytogenetycznych i molekularnych.

Cytometria przepływowa (ang. *flow cytometry*, FC) jest metodą diagnostyczną umożliwiającą ocenę immunofenotypu komórek hematopoetycznych z wykorzystaniem przeciwciał sprzężonych z fluorochromem, jest badaniem krytycznym podczas diagnostyki AML. Analiza cytometryczna przeprowadzona na aspiratach szpiku pomaga oszacować odsetek nacieczenia szpiku kostnego, co jest niezbędne zarówno w początkowej diagnozie AML, jak i dzięki określeniu fenotypu aberrantnego komórek białaczkowych, w ocenie minimalnej choroby resztkowej (ang. *mininal residual disease*, MRD).
Ocena cytogenetyczna i molekularna w AML pozwalają na identyfikację odrębnych podtypów AML, stratyfikację prognostyczną i wybór terapii dostosowanej do grup ryzyka, coraz częściej również terapii celowanych.

Kompleksowa ocena jest konieczna do właściwej klasyfikacji choroby, oceny rokowania oraz ustalenia dalszego postępowania terapeutycznego. Klasyfikację AML wg WHO.

Zgodnie z zaleceniem WHO, aby prawidłowo klasyfikować AML podczas wstępnej diagnozy oraz odpowiednio pokierować leczeniem, konieczne jest ustalenie grupy ryzyka dla danego pacjenta. Koncepcja ujednolicająca wytyczne NCCN (ang. *National Comprehensive Cancer Network*), ELN (ang. *European LeukemiaNet*) i ESMO (ang. *European Society for Medical Oncology*) dotyczące stratyfikacji ryzyka opiera się na nieprawidłowościach i mutacjach cytogenetycznych

Zgodnie z wytycznymi ESMO, AML z t(8;21)(q22;q22.1), inv(16)(p13;1q22) lub t(15;17)(q24.1;q21.2) są związane z korzystnym rokowaniem; prawidłowy kariotyp przewiduje rokowanie pośrednie, a złożone i monosomalne kariotypy zapowiadają złe rokowanie.

Klasyfikacja chorych do odpowiednich kategorii rozpoznania, grup ryzyka choroby oraz monitorowanie choroby resztkowej pozwalają na określenie indywidualnej, najskuteczniejszej strategii postępowania dla konkretnego pacjenta.

Po ustaleniu diagnozy i zastosowaniu chemioterapii indukującej remisję pacjenci z AML są zazwyczaj obserwowani w regularnych odstępach czasu w celu monitorowania odpowiedzi na leczenie i ewentualnego wczesnego wykrycia nawrotu choroby.

Leczenie indukujące remisję oraz leczenie poremisyjne zagadają stosowanie reżimów cytostatycznych a u chorych wysokiego ryzyka leczenie wspomagane jest allogenicznym przeszczepieniem macierzystych komórek krwiotwórczych. Dobór programu leczenia ostrej białaczki szpikowej zależy od stanu biologicznego pacjenta i czynników ryzyka choroby.

Celem leczenia pacjentów poniżej 60. roku życia lub starszych w dobrym stanie biologicznym jest wyleczenie. Dalsze decyzje terapeutyczne, leczenie podejmowane są w oparciu o stratyfikację cytogenetyczno-molekularną. Po leczeniu indukującym chorzy są kwalifikowani do jednego z wariantów leczenia poremisyjnego zależnie od grupy ryzyka cytogenetyczno-molekularnego według modyfikacji ELN *MD Anderson Cancer Center* (ELN/MDACC).

Pomimo upływu lat, wprowadzania nowych technik diagnostycznych i nowoczesnych terapii celowanych, uzyskiwane efekty u pacjentów z AML są wciąż niesatysfakcjonujące.

Hipoteza *badawcza pracy zakłada możliwy wpływ wybranych subpopulacji limfocytów T i zaburzenia prawidłowej ekspresji PD-1, PDL-1, CTLA-4 oraz B7-H3 oraz wpływ ekspresji PD-1, PDL-1, CTLA-4 oraz B7-H3 na komórkach białaczkowych (blastach) na skuteczność stosowanych reżimów cytostatycznych u pacjentów z AML. Hipoteza zakłada również możliwość wykorzystania inhibitorów immunologicznych punktów końcowych do poprawy skuteczności stosowanych chemioterapii.*
Celem *analizy naukowej było 1) określenie znaczenia prognostycznego subpopulacji limfocytów T u pacjentów z AML poddanych leczeniu standardowemu, 2) poszukiwanie zależności między ekspresją PD-1, PDL-1, CTLA-4 oraz B7-H3 a skutecznością leczenia, 3) ocena dystrybucji uzyskanych wyników badań immunologicznych w grupach ryzyka cytogenetyczno-molekularnego, żywotności oraz proliferacji blastów pacjentów z AML w odpowiedzi na blokowanie immunologicznych punktów kontrolnych z/bez dodatku chemioterapeutyku – cytarabiny oraz 4) ocena żywotności, proliferacji, zmian statusu aktywacyjnego limfocytów T w odpowiedzi na blokowanie immunologicznych punktów kontrolnych z/bez dodatku chemioterapeutyku – cytarabiny.*

Podstawą rozważań naukowych doktorantki stała się stale uaktualniana przez badaczy wiedza na temat roli układu immunologicznego w organizmie człowieka. Jak wiadomo, układ immunologiczny wypełnia swoje zadania nie tylko w obronie organizmu przed infekcjami i autoagresją, ale również chroni przed ekspansją komórek nowotworowych. Cytotoksyczne limfocyty T CD8+ (ang. cytotoxic T lymphocyte, CTL) i komórki NK (ang. natural killer), odgrywają kluczową rolę w hamowaniu rozwoju nowotworu. Immunologiczne mechanizmy efektorowe realizowane przez limfocyty T CD8+, które mogą uszkadzać komórki nowotworowe, wykazano m.in. na modelach mysich. W badaniach tych odrzucenie nowotworu było hamowane u myszy pozbawionych limfocytów T cytotoksycznych CD8+. Aktywowane w odpowiedzi przeciwnowotworowej limfocyty T CD8+ identyfikują antygeny nowotworowe przez prezentację antygenu przy udziale głównego układ zgodności tkankowej (*major histocompatibility complex;* MHC) klasy I. Po rozpoznaniu antygenu nowotworowego limfocyty T CD8+ zabijają komórki nowotworowe poprzez sekrecję m. in. perforyn i granzymów lub na drodze zależnej od interakcji FAS/FAS-L (ang. Fas cell surface death receptor/Fas cell surface death receptor-ligand), mogą także uszkadzać komórki nowotworowe partycypując w indukcji zapalenia typu Th1/Th17. Należy zauważyć jeden z możliwych mechanizmów ucieczki komórek nowotworowych spod nadzoru limfocytów T CD8+ przejawiający się zmniejszeniem poziomu ekspresji MHC klasy I, wobec czego antygeny nowotworowe mogą uniknąć kontroli i eliminacji. Co ważne, ekspresja MHC klasy I regulowana jest przez interferon gamma (INFγ) w sposób zależny od sygnalizacji receptora IFNγ poprzez JAK1 (pol. kinaza janusowa 1, ang. Janus kinase 1) i JAK2 (pol. kinaza janusowa 2, ang. Janus kinase 2). Dlatego mutacje w tych cząsteczkach prowadzą do braku odpowiedzi na IFNγ i pośredniczą w utracie rozpoznawania i zabijania przez cytotoksyczne limfocyty T CD8+ [72]. Z drugiej strony, utrata MHC klasy I zwiększa wrażliwość komórek nowotworowych na zabicie przez

komórki NK, a mechanizm ten można wykorzystać do wzmocnienia odpowiedzi przeciwnowotworowej na przykład poprzez stymulujące działanie IL-2 na komórki NK.
Limfocyty T CD4+ reprezentują wysoce niejednorodną populację komórek odporności adaptacyjnej. Ich polaryzacja zależy bezpośrednio od sposobu prezentacji antygenu oraz mikrośrodowiska cytokinowego, w jakim podlegają aktywacji. Klasycznie subopopulacje limfocytów T CD4+ obejmują linie Th1 (ang. type 1 helper T cell) i Th2 (ang. type 2 helper T cell), które są aktywowane w obecności odpowiednio IL-12 i IL-4. Po aktywacji komórki Th1 wydzielają IFNγ, czynnik martwicy nowotworu α (ang. tumor necrosis factor α, TNFα) i IL-2. Poprzez wytwarzanie tych cytokin, komórki Th1 regulują programy nadzoru immunologicznego poprzez zwiększenie przetwarzania i prezentacji antygenu na MHC I i II przez APC i wtórnie mogą regulować czas trwania i aktywność odpowiedzi limfocytów T cytotoksycznych CD8+. Ponadto, po aktywacji, limfocyty subpopulacji Th1 mogą bezpośrednio niszczyć komórki nowotworowe poprzez uwalnianie dużych ilości IFNγ oraz TNFα. Zatem odpowiedź limfocytów Th1 może bezpośrednio i pośrednio regulować aktywność przeciwnowotworową.

W przeciwieństwie do komórek Th1, limfocyty Th2 CD4+ na skutek aktywacji wytwarzają m. in. IL-4, -5, -6, -10 i -13, które modyfikują odporność nabytą, hamowanie cytotoksyczności zależnej od limfocytów T, a także wzmocnienie odporności humoralnej sterowanej przez limfocyty B. Kolejną niezwykle istotną grupą komórek biorących udział w regulacji odpowiedzi przeciwnowotworowej są limfocyty T regulatorowe. Treg stanowią subpopulację immunosupresyjnych limfocytów T CD4+. Ich cechą charakterystyczną jest ekspresja czynnika transkrypcyjnego białka P3 (ang. forkhead box P3, FOXP3), wysoka ekspresją CD25 (receptora IL-2) oraz niska ekspresja lub brak ekspresji CD127 (receptora IL-7) [80]. Treg hamują odpowiedź przeciwnowotworową w obrębie nowotworu. Istnieje kilka immunosupresyjnych mechanizmów działania Treg, włączając w to: hamowanie sygnałów kostymulacyjnych przez ekspresję CTLA-4, zużycie IL-2 przez wysoki poziom i powinowactwo receptora CD25, wydzielanie hamujących cytokin m. in. transformującego czynnika wzrostu β (ang. tumor growth factor β, TGF-β), IL-10 oraz IL-35 - ograniczających działanie efektorowe limfocytów Th1, Th17, cytotoksycznych limfocytów T CD8+ oraz komórek odpowiedzi nieswoistej.

W chorobach nowotworowych przewlekła stymulacja antygenowa doprowadza do zjawiska wyczerpania limfocytów T w mikrośrodowisku guza. Powoduje to zwiększoną ekspresję receptorów koinhibujących m. in. PD-1, TIM-3 (pol. immunoglobulina limfocytów T i domeny mucyny 3, ang. *T cell immunoglobulin and mucin domain 3*), LAG-3 (pol. gen 3. aktywacji limfocytów, ang. *lymphocyte activation gene 3*), dysfunkcję limfocytów T związaną pośrednio z działaniem IL-10 i TGF-β, obniżoną produkcję cytokin prozapalnych takich jak IL-2, IFNγ, TNFα i upośledzoną cytotoksyczność.

Limfocyty T na skutek połączenia receptora TCR z cząsteczką MHC prezentującą antygen komórki nowotworowej ulegają aktywacji, jednak złączenie się receptora kohamującego PD-1 na limfocycie T z ligandem PD-L1/L2 na komórce nowotworowej hamuje odpowiedź immunologiczną, produkcję cytokin prozapalnych, białek antyapoptotycznych, tym samym warunkując ucieczkę komórki

nowotworowej spod nadzoru immunologicznego. Ponadto, wyższe powinowactwo CTLA-4 (cytotoksyczny antygen 4 limfocytów T, *cytotoxic T cell antigen 4*) do ligandów CD80 i CD86 na APC uniemożliwia ich związanie z cząsteczką CD28, co skutecznie tłumi aktywację limfocytów T, doprowadza do ich anergii i wyczerpania i warunkuje przeżycie komórki nowotworowej. Zablokowanie zatem punktów kontroli immunologicznej – PD1, PD-L1 czy CTLA-4 za pomocą przeciwciał monoklonalnych, wyzwala odpowiedź immunologiczną limfocytów T przyczyniając się do śmierci komórki nowotworowej.

W związku z powyższym, wybór tematu rozprawy doktorskiej należy uznać za bardzo aktualny.

Rozprawa doktorska lekarz Małgorzaty Bernatowicz liczy 123 strony standardowego maszynopisu według typowego, powszechnie akceptowanego układu, który obejmuje: wstęp, w tym wprowadzenie, cele pracy, materiały i metodykę, wyniki wraz z ich omówieniem, dyskusję, wnioski, streszczenie, wykaz cytowanego piśmiennictwa, spis tabel i rycin. Autorka we wstępie zamieściła obszerny wykaz skrótów, pomocny w dalszej lekturze rozprawy. Streszczenie pracy zostało przetłumaczone na język angielski.

We wstępie pracy autorka w sposób szeroki, dość książkowy, jednak wydaje się potrzbny dla dobrego zrozumienia dalszych części rozprawy, opisuje podstawy rozpoznania, diagnostyki i postepowania terapeutycznego w chorych z rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej. W rozdziale doktorantka nie uniknęła błędów, zostały one omówione z doktorantką bezpośrednio, nie wpływają bowiem na jakość bardzo dobrej merytorycznie rozprawy doktorskiej.

W podrozdziale wprowadzenie doktorantka przedstawiła w sposób zwięzły i przejrzysty informacje na temat mechanizmów immunologicznych dotyczących immunologicznych punktów końcowych. Opisała mechanizmy aktywacji i dezaktywacji subpopulacji limfocytów T, oraz ich rolę w odpowiedzi przeciwnowotworowej.

W dalszej części rozprawy doktorantka w sposób klarowny przedstawia dane o fizjologii i patofizjologii immunoreceptora programowanej śmierci komórki (PD-1), jego ligandów wraz z mechanizmami hamowania szlaku sygnałowego programowanej śmierci komórki oraz receptora CTLA-4 i cząstki B7-H3. Przedstawia również dostępne obecnie blokery punktów końcowych układu immunologicznego. Na koniec przedstawia aktualne dane z piśmiennictwa na temat roli badanych cząstek w ostrej białaczce szpikowej oraz udziału blokerów immunologicznych punktów kontrolnych w terapii ostrej białaczki szpikowej.

W oparciu o przesłanki zawarte we wstępie Doktorantka sformułowała cele badań. Dla zrealizowania postawionych celów, po uzyskaniu stosownych zgód Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o nr. R-I-002/393/2018 doktorantka przeprowadziła analizy naukowe, w tym oznaczenia stężenia i aktywności punktów kontrolnych układu immunologicznego (PD-L1, CTLA-4, PD-1, B7-H3) w obrębie limfocytów T i blastów oraz badania hodowli komórkowych jednojądrzastych

komórek krwi obwodowej (ang. peripheral blood mononuclear cells, PBMC) uzyskanych od zrekrutowanych do badania chorych (72 pacjentów, w tym 35 kobiet i 37 mężczyzn w wieku od 19 do 76 lat; mediana 58 lat).

Badania przeprowadzono w Zakładzie Medycyny Regeneracyjnej i Immunoregulacji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Chorzy zostali zdiagnozowani wg obowiązujących standardów, a następnie wszyscy zrekrutowani pacjenci otrzymali leczenie cytostatyczne.

Wykorzystując metody badawcze, w tym hodowle komórkowe komórek białaczkowych z krwi obwodowej badanych, doktorantka oceniła odsetek wybranych subpopulacji limfocytów T CD3+CD4+ wykazujących ekspresję PD-1, PD-L1, CTLA-4, B7-H3 dzieląc wyniki na dwie grupy w zależności od uzyskanej u chorych na ostrą białaczką szpikową odpowiedzi na leczenia (remisja całkowita, CR vs brak remisji, NR) wykazując w analizie znamiennie wyższy odsetek limfocytów TCD3+CD4+ z ekspresją PD-1 u chorych nieodpowiadających na leczenie cytostatyczne.

W całej grupie badanej chorych z ostrą białaczką szpikową przy użyciu metody cytometrii przepływowa doktorantka oceniła poziomy ekspresji wybranych punktów kontroli immunologicznej na limfocytach T CD3+CD4+ w grupach z odpowiedzią CR vs NR. Statystyczną istotność wykazano w medianie fluorescencji dla PD-1 na limfocytach T CD3+CD4+ w grupie chorych z CR. Wynosiła ona 83,1 (40-380) i była znamiennie statystycznie niższa w porównaniu do pacjentów w grupie NR, gdzie wynosiła 235 (54-874), p=0,0149.

Oceny bezwzględnej liczby blastów CD33+ z ekspresją PD-1, PD-L1, CTLA-4 oraz B7-H3 w grupach pacjentów z odpowiedzią CR vs NR doktorantka przeprowadziła w całej grupie badanej z użyciem cytometrii przepływowej nie wykazując istotnych statystycznie różnic w grupach.

Doktorantka oceniała również poziomy ekspresji wybranych punktów kontroli immunologicznej na blastach CD33+ w grupach chorych na AML z odpowiedzią CR vs NR. Wykazano, iż wyższa ekspresja PD-1 na blastach CD33+ występuje znamiennie statystycznie częściej w grupie pacjentów odpowiadających całkowitą remisją na zastosowane leczenie chemioterapeutyczne. Wykazano natomiast znamienność statystyczną p<0,05 (p=0,0398) wobec poziomu ekspresji punktu kontroli immunologicznej CTLA-4 w obrębie blastów CD33+, mediana poziomu ekspresji CTLA-4 w grupie z CR wynosiła 63,3 (24,9-144) vs 95,3 (13,6-318) w grupie z NR (ryc. 10C). Wykazano, iż wyższa ekspresja punktu CTLA-4 na blastach CD33+ występuje znamiennie statystycznie częściej w grupie chorych nie odpowiadających na leczenie chemioterapeutyczne (NR).

***Ponadto** doktorantka przeprowadziła analizę dystrybucji badanych parametrów w grupach ryzyka cytogenetyczno-molekularnego. Jedynie w odniesieniu do poziomu ekspresji PD-L1 na limfocytach TCD3+CD4+ wykazano istotnie statystycznie wyższy poziom ekspresji PD-L1 na tych komórkach w grupie pośredniego ryzyka cytogenetyczno-molekularnego – grupa 2, w porównaniu do grupy*

niekorzystnego ryzyka cytogenetyczno-molekularnego – grupa 3, mediana poziomu ekspresji w grupie 2 wynosiła 397,5 vs 286 w grupie 3, p=0,0132.

***Doktorantka** pokusiła się również o analizę przeżycia chorych z AML w zależności od poziomu ekspresji (MFI) PD-1, PD-L1, CTLA-4 oraz B7-H3 na limfocytach T CD3+CD4+. Nie wykazano różnic istotnych statystycznie w odniesieniu do czasu przeżycia chorych z AML w zależności od poziomu ekspresji (MFI) PD-1, PD-L1, CTLA-4 oraz B7-H3 na limfocytach T CD3+CD4+.*

Jedynie w przypadku limfocytów T CD3+CD4+ wykazujących ekspresję receptora B7-H3 wykazano istotnie statystyczną różnicę. U chorych z AML wykazujących odsetek limfocytów T CD3+CD4+B7-H3+ powyżej średniej, ponad 2,5-krotnie skracał się czas przeżycia. Mediana czasu przeżycia chorych w grupie poniżej wartości średniej odsetka limfocytów T CD3+CD4B7-H3+ wynosiła 822 dni vs 358 dni w grupie z zakresem powyżej wartości średniej (HR 2,568; 95% CI 1,010-6,532; p=0,0475).

W mojej ocenie zaplanowanie doświadczeń oraz ich realizacja świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu metodycznym Doktorantki i są niewątpliwym wynikiem dużego doświadczenia badawczego i wiedzy promotora pracy Pana dr hab. n. med. Łukasza Bołkuna.

Dyskusja przeprowadzone została przez Doktorantkę w sposób dojrzały. Doktorantka odniosła własne wyniki do dostępnych danych literaturowych, a sposób przeprowadzenia analizy uzyskanych wyników potwierdza dobre przygotowanie merytoryczne i szeroką wiedzę w zakresie tematyki prowadzonych badań.

Interesującym uzupełnieniem tej części rozprawy jest odniesienie wyników Doktorantki do danych z literatury na temat hipotetycznych możliwości wykorzystania inhibitorów punktów końcowych w leczeniu nowotworów krwi, innych niż standardowe już leczenie chłoniaka Hodgkina, mogące w sposób synergistyczny lub addytywny wspomagać działanie klasycznych metod postępowania.

Ciekawe wydaje się również możliwe zastosowanie oceny poziomu ekspresji PD-1 na limfocytach T CD4+ oraz odsetek tych komórek u chorych z AML przed włączeniem leczenia, które może stanowić cenny czynnik predykcyjny i potencjalny biomarker immunologiczny w przewidywaniu uzyskania odpowiedzi na standardową chemioterapię.

Przeprowadzone badania stały się podstawą do sformułowania przez Autorkę 8 wniosków, których treść bardziej co prawda odpowiada wynikom, jednak nie umniejsza wartości pracy. Uzyskane przez doktorantkę wyniki upoważniają do stwierdzenia, że 1) u chorych na AML poddawanych chemioterapii ocena molekuł immunologicznych punktów końcowych, może w przyszłości stać się standardowym postepowaniem diagnostycznym oceniającym ryzyko braku uzyskania odpowiedzi na leczenie, 2) zastosowanie przeciwciał blokujących PD-1, PD-L1 lub CTLA4 w obecności lub braku cytarabiny nie wpływa wg uzyskanych danych na zwiększoną apoptozę blastów AML w hodowli in vitro, ale istotnie hamuje in vitro proliferację blastów w porównaniu do hodowli z samym

chemioterapeutykiem – konieczne są zatem dalsze analizy umożliwiające wyodrębnienie grup uzyskujących korzyść z takiego postępowania in vivo.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska lekarz Małgorzaty Bernatowicz charakteryzuje się trafnością wyboru tematu. Doktorantka wykazała się umiejętnością wykorzystania dostępnej bibliografii oraz formułowania celów planowanych badań naukowych i wniosków z nich wypływających. Zawarta w rozprawie analiza tematu jest spójna i przyczynia się do lepszego poznania omawianej tematyki, toteż jest cennym uzupełnieniem dostępnego piśmiennictwa naukowego. Autorka nie ustrzegła się błędów edycyjnych, które jednak nie umniejszają wartości pracy i zostały szczegółowo omówione z doktorantką. Autorka w pełni zrealizowała zaplanowany cel, dobrze opanowała niełatwy warsztat badawczy i wykazała doskonałe przygotowanie merytoryczne. Wartościowe wnioski można byłoby przeformatować, żeby jasno podkreślić wartość uzyskanych wyników. Rozprawa ma dużą wartość poznawczą i stanowi podstawę do kontynuowania badań naukowych w tej dziedzinie.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji praca autorstwa lekarz Małgorzaty Bernatowicz spełnia wszystkie warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 oraz art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U z 2018r poz. 1669 z późn.zm). Tym samym zwracam się do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lekarz Małgorzaty Bernatowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wnioskuję o uznanie pracy za wyróżniającą .

dr hab. n. med. Marzena Wątek